

농림수산물검역검사본부 공고 제2011-169호

“축산물의 가공기준 및 성분규격”을 다음과 같이 개정함에 있어 그 개정 내용과 취지를 국민에게 미리 알려 의견을 듣고자 그 주요내용을 행정절차법 제46조 규정에 의하여 다음과 같이 공고합니다.

2011년 12월 22일

농림수산물검역검사본부장

축산물의가공기준및성분규격 개정안 행정예고

1. 개정이유

- 가. 축산물에 대한 공통기준 및 규격에서 병·통조림축산물의 성분규격 중 주석의 성분규격에 주석의 검사가 불필요한 병 또는 알루미늄 재질 통조림은 제외한다는 규정 및 식육의 보존 및 유통기준을 신설하고자 함
- 나. 축산물별 개별기준 및 규격에서 축산물을 주원료로 제조한 제품을 축산물로 적용하고 명확히 유형을 구분하기 위해 유가공품, 식육가공품 및 알가공품의 유형을 확대 신설하고 개정하고자 함.
- 다. 「농수산물의 원산지 표시에 관한 법률」이 신설되어 한우확인시험이 농식품부로 이관됨에 따라 식품공전의 단일염기다형성 마커 이용법을 축산물의 시험방법 중 한우확인시험법으로 이관 신설하고자 함.

2. 주요내용

- 가. 축산물에 대한 공통기준 및 규격에서 병·통조림축산물의 성분규격 중 주석의 성분규격을 개정하고 식육의 보존 및 유통기준을 신설함

- 제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격 6. 병·통조림축산물의 성분규격 (3) 주석에 “병 또는 알루미늄 재질 통조림의 경우는 제외한다” 규정 추가
- 제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격 8. 보존 및 유통기준에 식육의 보존 및 유통기준을 신설
 - 바. 식육의 보존온도는 냉장제품은 $-2\sim 10^{\circ}\text{C}$ (다만, 가금육은 $-2\sim 5^{\circ}\text{C}$), 냉동제품은 -18°C 이하에서 보존 유통하여야 한다.
- 나. 축산물별 개별기준 및 규격에서 유가공품 중 농축유류, 유크림류, 버터류의 원료 범위를 확대하고 식육가공품 중 양념육류(육지물)를 양념육류로 하여 개정하고 양념육, 가열양념육 유형과 천연케이싱 유형 및 성분규격을 신설, 식육추출가공품에 식육추출가공육 유형을 신설, 베이컨류의 원료 범위를 명확히 개정, 갈비가공품과 건조저장육류에 사용 가능한 부원료 범위를 확대, 알가공품 중 알가열성형제품과 염지란의 부원료 범위를 확대하고 정의를 명확하게 개정함
- 제2. 축산물별 기준 및 규격 1. 유가공품 아. 농축유류와 (마) 가공연유에서 “원유 또는 저지방우유”를 “원유·우유류 또는 저지방우유류”로 하고 농축유류의 “(원유 또는 탈지유 100%, 식품 또는 식품첨가물은 제외)”를 삭제, 자. 유크림류와 (가) 유크림에서 “원유”를 “원유 또는 우유류”로, 차. 버터류와 (나) 가공버터에서 “원유 또는 우유”를 “원유 또는 우유류”로 개정
- 제2. 축산물별 기준 및 규격 2. 식육가공품 및 포장육 바. 양념육류(육지물)의 명칭을 양념육류로 하여 정의를 개정하고 유형으로 양념육, 가열양념육과 천연케이싱을 신설하고 가. 공통사항

(2) 성분규격 중 (나) 아질산이온, (다) 타르색소, (마) 보존료에 “천연케이싱은 제외한다”를 추가하여 개정

- 바. 양념육류 (1) 정의 “식육에 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 양념하거나 양념한 후 가열처리하여 냉장 또는 냉동한 것 또는 둔장, 양장 등 가축의 내장을 소금 또는 소금용액으로 염(수)장하여 식육이나 식육가공품을 담을 수 있도록 가공처리한 것을 말한다.
- 바. 양념육류 (2) (가) 양념육 : 식육에 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 양념한 것을 말한다(육함량 60% 이상).
- 바. 양념육류 (2) (나) 가열양념육 : 식육에 식품 또는 식품 첨가물을 첨가하여 양념한 후 가열처리한 것을 말한다(육함량 60% 이상).
- 바. 양념육류 (2) (다) 천연케이싱 : 둔장, 양장 등 가축의 내장을 소금 또는 소금용액으로 염(수)장하여 식육이나 식육가공품을 담을 수 있도록 가공처리한 것을 말한다.

○ 제2. 축산물별 기준 및 규격 2. 식육가공품 및 포장육 자. 식육 추출가공품에 식육추출가공육을 신설

- 자. 식육추출가공품 (2) (다) 식육추출가공육 : 단일원료 또는 혼합 원료를 그대로 추출한 후의 원료추출육을 말한다.

○ 제2. 축산물별 기준 및 규격 2. 식육가공품 및 포장육 라. 베이컨류에서 “특정부위육(등심육, 어깨부위육)”을 “특정부위육(등심, 목심, 갈비살)”로 개정

○ 제2. 축산물별 기준 및 규격 2. 식육가공품 및 포장육 마. 건조 저장육류에서 “조미료 및 향신료 등”을 “식품 또는 식품첨가물”로, 갈비가공품에서 “향신료 및 조미료 등으로”를 “식품 또는 식품 첨가물을 첨가하여”로 개정

- 제2. 축산물별 기준 및 규격 3. 알가공품 (2) (사) 알가열성형제품을 개정하고, (아) 염지란에서 “조미액에 일정시간 조리거나 조미료 및 향신료를 첨가하여 포장한 것”을 “식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 이를 일정시간 조리거나 가공한 것”으로 개정
 - 알가열성형제품을 “알을 원료로 하여 그대로 또는 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 응고온도 이상으로 가열, 살균 등의 열처리공정을 거치거나 이를 성형시킨 것을 말한다(알 내용물 30% 이상).”로 개정
- 다. 식육 시험법 중 한우확인시험법에 식품공전의 단일염기다형성 마커 이용법을 제2법으로 신설하고 개정함.
- 제3. 축산물 시험방법 IV. 2. 식육 시험법 (나) (4) 한우확인시험법에 “(제2법) 단일염기다형성 마커 이용법”을 신설하고 (2) 판별시험 (가) 쇠고기 검체에서 DNA 추출과 (나) DNA 농도측정에 부가 설명을 추가
 - (가)쇠고기 검체에서 DNA 추출 ※ 아래의 DNA추출법 이외에도 시중에 통상적으로 판매되는 Genomic DNA추출키트도 가능하며, 시료간 오염, 이물질의 유입 등이 없는 한 지정된 검사기관에서 자체적 개발(또는 모방)한 추출방법도 가능하다.
 - (나) DNA농도측정 ※ 아래의 DNA 농도측정 방법 이외에도 일반적 DNA농도측정기, 아가로즈겔 전기영동을 이용하는 방법, DNA정량측정용 시약 등의 방법으로 농도, 순도를 측정할 수 있다.
- 라. 개정안은 농림수산검역검사본부 홈페이지(www.qia.go.kr>알림마당-동축산물>법령/고시>검역검사본부 입법행정예고)에 등재되어 있으니 참고하여 주시기 바랍니다.

3. 의견제출

이 개정안에 대한 의견이 있는 단체 또는 개인은 2012년 1월 13일 까지 다음 사항을 기재한 의견서를 농림수산검역검사본부(경기도 안양시 만안구 안양로 175(안양6동 480), 전화 031-467-1992, 팩스 031-467-1989)에 제출하여 주시기 바랍니다.

가. 공고사항에 대한 항목별 의견(찬·반 여부와 그 사유)

나. 성명(단체의 경우에는 단체명, 대표자 성명), 전화번호 및 주소

신 · 구조문대비표

현 행	개 정 안
<p><따로 붙임> 제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격 1.~5. 생략 6. 축산물의 성분규격 가. 생략 나. 병·통조림축산물의 성분규격 (1)~(2) 생략 (3) <u>주석(mg/kg) :150이하</u> (4)~(5) 생략 8. 보존 및 유통기준 가.~마. 생략 바. <u>신설</u> 나.~더. 생략</p> <p>제2. 축산물별 기준 및 규격 1. 유가공품 아. 농축유류 (1)정의 <u>농축유류라 함은 원유 또는 저지방 우유를 그대로 농축한 것이거나 식품 또는 식품첨가물을 가하여 농축한 것을 말한다(원유 또는 탈지유 100%, 식품 또는 식품첨가물은 제외)</u> (2) 축산물가공품의 유형</p>	<p><따로 붙임> 제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격 1.~5. 현행 유지 6. 축산물의 성분규격 가. 생략 나. 병·통조림축산물의 성분규격 (1)~(2) 현행 유지 (3) <u>주석(mg/kg) :150이하(병 또는 알루미늄 재질 통조림의 경우는 제외한다)</u> (4)~(5) 현행 유지 8. 보존 및 유통기준 가.~마. 현행 유지 바. <u>식육의 보존온도는 냉장제품은 -2~10℃(다만, 가금육은 -2~5℃), 냉동제품은 -18℃ 이하에서 보존 유통하여야 한다.</u> 사.~러. 변경</p> <p>제2. 축산물별 기준 및 규격 1. 유가공품 아. 농축유류 (1)정의 <u>농축유류라 함은 원유·우유류 또는 저지방우유류를 그대로 농축한 것이거나 식품 또는 식품첨가물을 가하여 농축한 것을 말한다.</u> (2) 축산물가공품의 유형</p>

현 행	개 정 안
<p>(가)~(라) 생략</p> <p>(마) 가공연유 : 원유에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 농축한 것으로 유고형분 22.0%이상의 것을 말한다.</p> <p>자. 유크림류</p> <p>(1) 정의</p> <p>유크림류라 함은 원유 또는 우유에서 분리한 유지방분 또는 이에 식품이나 식품첨가물 등을 가한 것을 각각 살균 또는 멸균처리한 것이나 이를 분말화한 것을 말한다.</p> <p>(가) 유크림 : 원유 또는 우유에서 분리한 유지방분으로 - 생략 -</p> <p>(나) 생략</p> <p>차. 버터류</p> <p>(1) 정의</p> <p>버터류라 함은 원유에서 유지방분을 분리한 것이나 발효시킨 것을 그대로 또는 이에 다른 식품이나 식품첨가물 등을 가하여 각각 교반, 연압한 것을 말한다.</p> <p>(가) 생략</p> <p>(나) 가공버터 : 원유의 유지방분을 - 생략 -</p> <p>(다) 생략</p>	<p>(가)~(라) 현행 유지</p> <p>(마) 가공연유 : 원유·우유류 또는 저지방우유류에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 농축한 것으로 유고형분 22.0%이상의 것을 말한다.</p> <p>자. 유크림류</p> <p>(1) 정의</p> <p>유크림류라 함은 원유 또는 우유류에서 분리한 유지방분 또는 이에 식품이나 식품첨가물 등을 가한 것을 각각 살균 또는 멸균처리한 것이나 이를 분말화한 것을 말한다.</p> <p>(가) 유크림 : 원유 또는 우유류에서 분리한 유지방분으로 - 생략 -</p> <p>(나) 현행 유지</p> <p>차. 버터류</p> <p>(1) 정의</p> <p>버터류라 함은 원유 또는 우유류에서 유지방분을 분리한 것이나 발효시킨 것을 그대로 또는 이에 다른 식품이나 식품첨가물 등을 가하여 각각 교반, 연압한 것을 말한다.</p> <p>(가) 현행 유지</p> <p>(나) 가공버터 : 원유 또는 우유류의 유지방분을 - 현행 유지 -</p> <p>(다) 현행 유지</p>

현 행	개 정 안												
<p>제2. 축산물별 기준 및 규격</p> <p>가. 공통사항</p> <p>(2) 성분규격</p> <p>(가) 정상 : 고유의 색택을 가지고 이 미·이취가 없어야 한다.</p> <p>(나) 아질산이온(g/kg) : 0.07이하 (다만, 포장육은 제외한다)</p> <p>(다) 타르색소 : 검출되어서는 아니 된다(다만, 소시지류는 제외한다)</p> <p>(라) ~ (마) 생략</p> <p>(바) 보존료(g/kg) : 다음에서 정하는 이외의 보존료가 검출되어서는 아니된다.</p>	<p>제2. 축산물별 기준 및 규격</p> <p>가. 공통사항</p> <p>(2) 성분규격</p> <p>(가) 정상 : 현행 유지</p> <p>(나) 아질산이온(g/kg) : 0.07이하 (다만, 포장육, 천연케이싱은 제외한다)</p> <p>(다) 타르색소 : 검출되어서는 아니된다 (다만, 소시지류, 천연케이싱은 제외한다)</p> <p>(라) ~ (마) 현행 유지</p> <p>(바) 보존료(g/kg) : 다음에서 정하는 이외의 보존료가 검출되어서는 아니 된다.(다만, 천연케이싱은 제외한다)</p>												
<table border="1"> <tr> <td>소르빈산</td> <td></td> </tr> <tr> <td>소르빈산칼륨</td> <td>2.0이하(생략)</td> </tr> <tr> <td>소르빈산칼슘</td> <td></td> </tr> </table>	소르빈산		소르빈산칼륨	2.0이하(생략)	소르빈산칼슘		<table border="1"> <tr> <td>소르빈산</td> <td></td> </tr> <tr> <td>소르빈산칼륨</td> <td>2.0이하(현행 유지)</td> </tr> <tr> <td>소르빈산칼슘</td> <td></td> </tr> </table>	소르빈산		소르빈산칼륨	2.0이하(현행 유지)	소르빈산칼슘	
소르빈산													
소르빈산칼륨	2.0이하(생략)												
소르빈산칼슘													
소르빈산													
소르빈산칼륨	2.0이하(현행 유지)												
소르빈산칼슘													
<p>(사) ~ (아) 생략</p> <p>바. 양념육류(육지물)</p> <p>식육에 식염, 조미료, 향신료 등으로 양념하고 냉장 또는 냉동한 것으로 육함량 60%이상의 것을 말한다(뼈가 붙어 있는 것도 포함).</p> <p>(2) 신설</p>	<p>(사) ~ (아) 현행 유지</p> <p>바. 양념육류</p> <p>(1) 정의</p> <p>식육에 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 양념하거나 양념한 후 가열처리하여 냉장 또는 냉동한 것 또는 돈장, 양장 등 가축의 내장을 소금 또는 소금용액으로 염(수)장하여 식육이나 식육가공품을 담을 수 있도록 가공처리한 것을 말한다.</p> <p>(2) 축산물가공품의 유형</p> <p>(가) 양념육 : 식육에 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 양념한 것을 말한다(육함량 60% 이상).</p> <p>(나) 가열양념육 : 식육에 식품 또는 식품 첨가물을 첨가하여 양념한 후 가열처리한 것을 말한다(육함량 60% 이상).</p>												

현행	개정안
<p>제2. 축산물별 기준 및 규격</p> <p>2. 식육가공품 및 포장육</p> <p>자. 식육추출가공품</p> <p>(1) 생략</p> <p>(2) 축산물가공품의 유형</p> <p>(가)~(나) 생략</p> <p>(다) <u>신설</u></p> <p>라. 베이컨류</p> <p>돼지의 복부육(삼겹살) 또는 <u>특정부위육(등심육, 어깨부위육)</u>을 정형한 것을 염지한 후 훈연하거나 가열처리한 것을 말한다.</p> <p>마. 건조저장육류</p> <p>식육을 그대로 또는 이에 <u>조미료 및 향신료</u> 등을 첨가하여 건조하거나 열처리하여 건조한 것을 말하며 수분 55%이하의 것을 말한다(육함량 85%이상의 것).</p>	<p>(다) <u>천연케이싱 : 돈장, 양장 등 가족의 내장을 소금 또는 소금용액으로 염(수)장하여 식육이나 식육가공품을 담을 수 있도록 가공처리한 것을 말한다.</u></p> <p>제2. 축산물별 기준 및 규격</p> <p>2. 식육가공품 및 포장육</p> <p>자. 식육추출가공품</p> <p>(1) <u>현행 유지</u></p> <p>(2) 축산물가공품의 유형</p> <p>(가)~(나) <u>현행 유지</u></p> <p>(다) <u>식육추출가공육 : 단일원료 또는 혼합원료를 그대로 추출한 후의 원료추출육을 말한다.</u></p> <p>라. 베이컨류</p> <p>돼지의 복부육(삼겹살) 또는 <u>특정부위육(등심, 목심, 갈비살)</u>을 정형한 것을 염지한 후 훈연하거나 가열처리한 것을 말한다.</p> <p>마. 건조저장육류</p> <p>식육을 그대로 또는 이에 <u>식품 또는 식품첨가물</u>을 첨가하여 건조하거나 열처리하여 건조한 것을 말하며 수분 55% 이하의 것을 말한다(육함량 85%이상의 것).</p>

현행	개정안
<p>아. 갈비가공품 식육의 갈비부위(뼈가 붙어 있는 것에 한한다)를 정형하여 <u>향신료 및 조미료 등으로 양념하고 훈연하거나 열처리한 것을 말한다</u></p> <p>3. 알가공품 (1) 생략 (2) 축산물가공품의 유형 (가)~(바) 생략 (사) 알가열성형제품 : <u>알의 응고온도 이상으로 가열, 살균 등의 열처리공정을 거쳐 성형시킨 것을 말한다</u> (알 내용물 30% 이상). (아) 염지란 : 알을 삶은 후 그대로 또는 할란하여 <u>조미액에 일정시간 조리거나 조미료 및 향신료를 첨가하여 포장한 것을 말한다</u> (알 내용물 50% 이상)</p> <p>제3. 축산물 시험방법 IV. 원유·식육·원료알의 시험법 2. 식육 시험법 (나) 특수검사법 (4) 한우확인시험법 가) (제1법) 초위성체 마커 이용법 나) (제2법) <u>단일염기다형성 마커 이용법</u> <u>식품공전 시험법을 준용한다.</u></p>	<p>아. 갈비가공품 식육의 갈비부위(뼈가 붙어 있는 것에 한한다)를 정형하여 <u>식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 양념하고 훈연하거나 열처리한 것을 말한다</u></p> <p>3. 알가공품 (1) 현행 유지 (2) 축산물가공품의 유형 (가)~(바) 현행 유지 (사) 알가열성형제품 : <u>알을 원료로 하여 그대로 또는 식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 응고온도 이상으로 가열, 살균 등의 열처리공정을 거쳐거나 이를 성형시킨 것을 말한다</u>(알 내용물 30% 이상). (아) 염지란 : 알을 삶은 후 그대로 또는 할란하여 <u>식품 또는 식품첨가물을 첨가하여 이를 일정시간 조리거나 가공한 것을 말한다</u>(알 내용물 50% 이상)</p> <p>제3. 축산물 시험방법 IV. 원유·식육·원료알의 시험법 2. 식육 시험법 (나) 특수검사법 (4) 한우확인시험법 가) (제1법) 초위성체 마커 이용법 나) (제2법) <u>단일염기다형성 마커 이용법</u></p>

단일염기다형성 마커 이용법은 한우 판별 마커*(marker)를 사용하여 한우와 비한우(육우, 젖소, 수입산을 포함한다. 이와 같이 한다)를 판별하는 방법으로서 소의 염색체 내에서 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)이 발생하는 빈도를 한우와 비한우에서 각각 측정하여 차이를 보이는 경우, 이를 후보 마커로 이용하여 최적의 마커조합을 구성한 다음, 한우와 비한우를 판별한다.

최종 선발된 90개의 단일염기다형성(SNP) 마커를 조합하여 한우와 비한우를 판별하도록 한다. 본 마커조합은 단일 마커가 아닌 90개의 마커가 지닌 판별력을 동시에 측정함으로써 판별의 정확도가 매우 높아 한우 판별에 적합하다. 쇠고기 시료의 DNA에서 실험을 통해 90개 마커 각각의 유전형을 알아낸 후 각 마커의 유전형에 따른 고유의 판별값을 이용하여 한우와 비한우를 구분한다.

* 마커(marker) : 생명체가 가지고 있는 DNA 염기서열중 특수한 목적으로 선별된 표지 유전자 서열 및 부위

(1) 검체의 채취

검체의 채취는 식품공전의 “제2. 검체의 채취 및 취급방법”을 기본 원칙으로 다음과 같이 한다.

(가) 검체 채취와 동시에 음식점의 식육 표시내용(한우, 육우, 젖소, 수입육 등)을 채취용 용기에 기입한다.

(나) 채취된 식육 검체가 손상되지 않도록 주의하여야 하고, 미생물의 오염 등이 되지 않도록 주의한다.

(다) 검체채취 기구 및 용기

① 기구 및 용기는 멸균된 일회용 용기를 이용하며 운반시 파손 및 오염의 위험이 없는 것을 사용한다.

② 검체와 직접 접촉하는 기구 및 용기는 검사결과에 영향을 미치지 않는 것으로 한다.

③ 검체채취 및 기구·용기의 종류

- 채취용 기구 : 핀셋, 1회용 칼 등
- 채취용 용기·포장 : 검체봉투 등
- 소독용구 : 비닐 위생장갑, 알코올, 솜 등
- 기 타 : 테이프, 아이스박스, 사진기, 필기구, 아이스팩 등

(라) 검체수거 방법

① 채취자는 일회용 비닐 위생장갑을 착용하고 약 30~50g (손가락 마디 하나 크기)정도를 채취하여 즉시 검체봉투에 넣어 봉인한다.

② 정보 기입시에는 유성펜을 이용하며, 누구나 알아볼 수 있는 관련 정보를 명시한다.

(마) 검체의 운반 요령

① 채취된 검체는 오염, 파손, 손상, 변형 등이 되지 않도록 주의하여 운반한다.

② 장거리 운송시 검체는 냉장상태를 유지하면서 운반한다.

③ 멸균용기에 채취하여 24시간 이내에 식품위생검시기관에 운반하여야 하며 부득이한 사정으로 즉시 송부하지 못할 때에는 냉동 보관한다.

④ ‘음식점 식육 원산지 표시제’와 관련된 검체 수거시에는 서류검사와 시험

분석을 병용하기 위해 수거 시료에 대한 정확한 정보가 요구되어, 다음 관련 서류 사본을 함께 확보하도록 한다.

※ 음식점영업자 확인서, 등급판정 확인서, 거래명세표, 검사증명서 등의 관련 서류사본

(바) 검체의 보관 : 검체가 변질되지 않도록 냉동, 밀폐 보관한다.

(2) 판별 시험

※ 한우판별에 대한 시험법은 이 공전에 있는 간이시험방법(KoBreed kit)으로 시험함을 원칙으로 한다.

(가) 쇠고기 검체에서 DNA 추출

※ 아래의 DNA추출법 이외에도 시중에 통상적으로 판매되는 어떠한 Genomic DNA추출키트 (Promega사의 추출키트, 코젠바이오텍사 추출키트, Qiagen 추출키트 등)도 가능하며, 시료간 오염, 이물질의 유입 등이 없는 한 지정된 검사기관에서 자체적 개발 (또는 모방)한 추출방법도 가능하다.

- ① 0.5 g의 검체를 잘게 다져 1.5 mL 튜브에 옮긴다.
- ② 핵산 해리 혼합액을 300 uL 첨가하고 단백질분해효소 K (20mg/mL 농도)를 10 uL 첨가한다.
- ③ 잘 혼합한 후 검체가 완전히 용해될 때 까지 55°C 항온수조에 둔다 (약 40분~1시간 30분). 이때 10분 간격으로 약 10~20초 간 혼합기를 이용하여 잘 혼합한다.
- ④ 얼음 위에 3분 간 둔 뒤 단백질 침전 용액을 100 uL 첨가한 후 20초 간 혼합기를 이용하여 잘 혼합한다.
- ⑤ 얼음 위에 5분 간 둔 뒤 14,000 G 에서 5분 간 원심분리한다.
- ⑥ 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮기고 이소프로판올 300uL를 첨가하여 위 아래로 뒤집으며 잘 섞어준다.
- ⑦ 14,000 G 에서 5분 간 원심분리한다.
- ⑧ 상층액을 피펫으로 DNA 응축물이 없어지지 않도록 조심스럽게 버린다.
- ⑨ 70% 에탄올을 1 mL 넣고 2~3번 위 아래로 뒤집으며 잘 섞은 뒤 14,000 G 에서 5분 간 원심분리한다.
- ⑩ 상층액을 피펫으로 DNA 응축물이 없어지지 않도록 조심스럽게 버리고 상온에서 DNA 응축물을 건조시킨다 (약 5분 간 상온에 방치).
- ⑪ RNA 분해효소가 첨가된 DNA 재수화 용액 50 uL를 가한다.
- ⑫ 튜브 끝을 손가락으로 가볍게 치면서 DNA 응축물을 녹인다.

[시약의 조제]

① 핵산 해리 혼합액

Nucleic lysis solution (Promega A7943 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품) 500 uL 당 0.5 M EDTA를 120 uL를 첨가해서 조제한다.

② RNA 분해효소가 첨가된 DNA 재수화(rehydration) 용액

DNA rehydration solution 1mL 당 RNase(4 mg/mL) 10 uL를 첨가하여 조제한다.

(나) DNA 농도측정

※ 아래의 DNA농도측정 방법 이외에도 일반적 DNA농도측정기, 아가로즈겔 전기영동을 이용하는 방법, DNA정량측정용 시약 등의 방법으로 농도, 순도를 측정할 수 있다.

- ① 모든 DNA 시료 농도는 피코그린 DNA 정량 용액(Molecular probe Cat# P-7581 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품)과 lambda DNA (Invitrogen Cat# 25250-28 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는

제품)를 이용하여 측정한다.

- ② Lambda DNA 표준액을 만들기 위해 lambda DNA 원액을 각각 0, 1.5262, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/uL의 농도로 희석한다.
- ③ 농도별 lambda DNA 희석 시료 2 uL를 98 uL의 피코그린 희석 용액에 넣고 빛이 없는 곳에서 30분 간 상온에서 반응한 후 자외선흡광광도계 (480 nm/520 nm)로 측정한다.
- ④ 측정된 값과 희석된 농도값을 기초로 표준곡선을 작성한다.
- ⑤ DNA 시료는 원액 2 uL를 TE 완충액(pH 8.0)으로 10배 희석하여 위와 같은 방법으로 측정하며 표준곡선을 이용하여 정확한 농도를 산출한다. 이때 DNA의 농도가 100 ng/uL 이상이거나 1 ng/uL 이하일 경우 다시 희석하여 재측정한다.
- ⑥ 최종 DNA 농도가 50 ng/uL이 되도록 TE 완충액(pH 8.0)에 희석한다.

[시약의 조제]

① 피코그린 희석 용액

피코그린 시약을 TE 완충액(pH 8.0)을 사용하여 1:200으로 희석한다.

② TE 완충액(pH 8.0)

각각의 최종농도가 10mM Tris-염산용액(pH 8.0), 1mM EDTA 용액 (pH 8.0)이 되도록 멸균증류수를 사용하여 조제한다.

(다) 판별 마커의 게노타이핑(genotyping)

— 준비된 DNA 시료(50 ng/uL)에 대하여 다음의 과정에 따라 실험한다.

① DNA 플레이트 준비

- ㉠ DNA 플레이트에 5 uL의 DNA 플레이트 제조용 시약을 넣고 DNA 시료(50 ng/uL)를 옮겨 넣는다.
- ㉡ DNA 플레이트를 가열기로 봉합하고 90°C로 예열 시켜놓은 가열기에서 30분간 반응시킨다.
- ㉢ 가열 봉합재를 용액이 튀지 않도록 조심스럽게 제거한 후 5 uL의 침전시약을 넣고 용액이 청색으로 변할 때 까지 충분히 혼합한다.
- ㉣ 15 uL의 2-프로필알콜을 넣고 3000 G로 20분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 상온에서 15~20분간 말린다.
- ㉤ DNA 플레이트의 각 칸에 10 uL의 혼탁액을 넣고 청색의 침전물이 완전히 풀어질 때까지 충분히 혼합한다.

② 유전형특이연장반응용(Allele-Specific Extension) 플레이트 준비

- ㉠ 유전형특이연장반응용 플레이트 각 칸에 10 uL의 올리고시약을 넣고 30 uL의 올리고 혼성 집합시약을 추가로 넣는다.
- ㉡ DNA 플레이트의 봉합을 조심스럽게 제거하고 10 uL의 DNA 반응액을 유전형특이연장반응용 플레이트로 옮기고 비드가 완전히 풀어질 때까지 충분히 혼합한다.
- ㉢ 70°C로 예열된 가열기에 유전형특이연장반응용 플레이트를 놓고, 즉시 가열기를 30°C로 맞춘다. 30°C로 온도가 떨어질 때까지 놓아둔다.

③ 연장(Extension) 및 집합(Ligation) 반응

- ㉠ 2분 동안 또는 비드가 한 곳으로 모일 때까지 자석 플레이트 위에 유전형특이연장반응용 플레이트를 올려놓고 비드를 제외한 상층액(~50 uL)을 제거하고 50 uL의 연장집합반응 혼합용액을 넣는다.
- ㉡ 비드가 완전히 풀어질 때까지 충분히 혼합한다.
- ㉢ 다시 자석 플레이트 위에 유전형특이연장반응용 플레이트를 올려놓고 비드를 제외하고 연장집합반응 혼합용액을 제거한다.

㉒ ㉑, ㉒의 과정을 반복한다.

㉓ 8-채널 피펫을 사용하여 50 uL의 범용완충액을 유전형특이연장반응용 플레이트의 각 칸에 넣고 2분 동안 비드가 한 곳으로 모일 때까지 자석 플레이트 위에 유전형특이연장반응용 플레이트를 올려놓는다.

㉔ 8-채널 피펫을 사용하여 비드를 제외하고 범용완충액을 제거한다.

㉕ ㉓, ㉔의 과정을 반복한다.

㉖ 8-채널 피펫을 사용하여 37 uL 연장접합반응 효소를 유전형특이연장 반응용 플레이트의 각 칸에 넣어주고 플레이트를 접착 필름으로 봉합한 다음 비드가 풀어지도록 1,600~1,700 G으로 비드가 완전히 풀어질 때까지 1분간 충분히 혼합한다.

㉗ 유전형특이연장반응용 플레이트를 45°C로 예열시킨 가열기에서 15분간 반응시킨다.

④ PCR 반응

㉘ PCR 혼합용액 튜브에 64 uL의 DNA 중합효소와 50 uL의 Uracil DNA glucosylase를 넣고 충분히 혼합하고 PCR 플레이트에 PCR 혼합액을 30 uL씩 분주한다.

㉙ 2분 동안 또는 비드가 한곳으로 몰릴 때까지 자석 플레이트 위에 유전형특이연장반응용 플레이트를 올려놓고 비드를 제외한 상층액 (~50 uL)를 제거한 후 50 uL의 범용완충액을 넣어준다.

㉚ 다시 비드가 모일 수 있도록 자석 플레이트 위에 2분 동안 올려고 상층액을 모두 제거하고 35 uL의 DNA 해리용액을 유전형특이연장반응용 플레이트의 각 칸에 넣어준다.

㉛ 비드를 풀어주기 위해 1,800-1,900 G으로 1분간 충분히 혼합하고 95°C로 예열시킨 가열기에 1분 동안 올려놓는다.

㉜ 가열기에서 플레이트를 꺼낸 뒤 2분 동안 또는 비드가 모일때까지 자석 플레이트 위에 플레이트를 올려놓은 후 30 uL 상층액을 PCR 플레이트로 옮긴다.

㉝ PCR 플레이트를 가열 봉합하고 유전자 증폭 장비로 즉시 옮긴다.

㉞ 유전자 증폭 장비의 PCR 반응을 다음 그림과 같이 수행한다.

⑤ PCR 반응체의 결합 과정

㉟ 비드용액을 충분히 혼합한 후, 20 uL씩 PCR 플레이트로 옮겨 잘 섞은 후 필터 플레이트로 옮긴다.

㊱ 커버로 덮고 빛을 차단한 채로 상온에서 60분간 두어 결합이 일어나도록 한다.

⑥ VeraCode 비드 플레이트 용 중간 플레이트 준비

㊲ 빈 96 칸 규격의 폐물 수거 플레이트 위에 필터 플레이트 어댑터를 놓고 PCR 반응액이 들어있는 필터 플레이트를 올려놓는다.

- ㉔ 25℃ 에서 1,000 G(~2,000 G)로 5분 동안 원심분리한다.
- ㉕ 50 uL의 범용완충액을 필터 플레이트에 넣고 25℃에서 1,000 G (~2,000 G)로 5분 동안 원심분리한다.
- ㉖ 30 uL의 혼성용액을 중간 플레이트에 분주한다.
- ㉗ 중간 플레이트와 폐물 수거 플레이트를 교체하고 30 uL의 0.1N 수산화 나트륨을 필터 플레이트에 분주한다.
- ㉘ 즉시 25℃에서 1000 G(~2,000 G)로 5분간 원심분리한다.
- ⑦ VeraCode 비드 플레이트의 혼성 반응
- ㉙ 15 mL 튜브에 3 mL의 혼성용액과 3 mL의 0.1N 수산화나트륨 용액을 넣고 충분히 혼합하여 혼성용액을 중화시킨다.
- ㉚ 50 uL의 중화된 혼성용액을 중간 플레이트의 각 칸에 분주하고 중간 플레이트 안의 시료를 4~5회 피펫으로 섞어준다.
- ㉛ 100 uL의 반응체를 VeraCode 비드 플레이트에 옮긴다.
- ㉜ 시료가 들어있는 VeraCode 비드 플레이트를 3시간 동안 혼성 (850 G, 45℃) 시킨다.
- ㉝ VeraCode 비드 플레이트에 200 uL의 세척액을 첨가하고 각 칸의 용액을 피펫으로 섞어준다.
- ㉞ 각 칸 바닥에 비드가 모이도록 2분 동안 기다린 후 상층액을 제거한다.
- ㉟ ㉝, ㉞의 과정을 반복한다.
- ⑧ VeraCode 비드 플레이트 스캐닝
- 반응과정이 끝난 VeraCode 비드 플레이트를 BeadXpress reader로 스캐닝한다. 스캐닝이 완료되면 비드스튜디오 소프트웨어를 이용하여 게노타입을 결정한다.
- ⑨ 최종 게노타입은 키트 내의 설명에 따라 비드스튜디오 소프트웨어의 보고서 형식을 이용하여 파일 형태로 출력한다.
- (라) 결과판정
- ① 최종 게노타입 파일을 표 1의 한우 판별식*에 의하여 자동 분석하여 판정한다.
- * 한우 판별식
- SNP별 각각의 게노타입을 표 2와 같이 AA형=0, AB형=1, BB형=2에 해당하는 값을 넣고 한우와 비한우를 각각 0과 1로 판별하는 표 1의 공식에 대입한다. 이때 게노타입에 손실이 있을 경우, 표 2의 해당 값(평균값)을 넣는다.
- ② 판별분석에 의한 추정값이 0.45 이하이면 “한우”로 판정하며, 0.45 보다 크면 “비한우”로 판정한다.

표 1. 한우 판별

$$\begin{aligned} \text{추정값} = & 0.43173 + \text{Btau00423} \times 0.05745 + \text{Btau00498} \times -0.028 + \text{Btau00542} \times 0.0411 + \text{Btau00664} \times 0.03 \\ & 129 + \text{Btau00673} \times -0.0238 + \text{Btau00852} \times -0.01983 + \text{Btau00853} \times 0.03919 + \text{Btau00926} \times 0.02612 + \text{Bta} \\ & \text{u01038} \times -0.03568 + \text{Btau01227} \times 0.04431 + \text{Btau01397} \times 0.01901 + \text{Btau01591} \times -0.01982 + \text{Btau01782} \\ & \times 0.04025 + \text{Btau01804} \times 0.03447 + \text{Btau01839} \times -0.01368 + \text{Btau02018} \times 0.02279 + \text{Btau02057} \times -0.0214 \\ & + \text{Btau02109} \times 0.02794 + \text{Btau02133} \times 0.02246 + \text{Btau02265} \times 0.02581 + \text{Btau02266} \times 0.01842 + \text{Btau023} \\ & 49 \times 0.03547 + \text{Btau02443} \times 0.02833 + \text{Btau03016} \times -0.05403 + \text{Btau03062} \times -0.02018 + \text{Btau0310} \times 0.015 \\ & 46 + \text{Btau03113} \times 0.02237 + \text{Btau03217} \times 0.03226 + \text{Btau03224} \times -0.03024 + \text{Btau03234} \times -0.02746 + \text{Bta} \\ & \text{u03256} \times 0.02839 + \text{Btau03281} \times -0.02346 + \text{Btau03290} \times 0.03198 + \text{Btau03315} \times 0.02413 + \text{Btau03318} \times \\ & 0.02768 + \text{Btau03324} \times 0.02111 + \text{Btau03334} \times 0.04778 + \text{Btau03344} \times 0.01775 + \text{Btau03413} \times -0.03795 + \\ & \text{Btau03478} \times -0.02023 + \text{Btau03480} \times 0.04605 + \text{Btau03514} \times 0.02673 + \text{Btau03567} \times 0.04433 + \text{Btau035} \end{aligned}$$

$72 \times 0.05075 + \text{Btau03612} \times 0.01943 + \text{Btau03654} \times -0.02247 + \text{Btau03656} \times 0.05059 + \text{Btau03717} \times -0.04446 + \text{Btau03760} \times 0.03482 + \text{Btau03782} \times 0.02625 + \text{Btau03807} \times -0.02885 + \text{Btau03816} \times 0.0241 + \text{Btau03829} \times 0.0241 + \text{Btau03845} \times 0.0517 + \text{Btau03880} \times -0.02683 + \text{Btau03932} \times 0.04049 + \text{Btau03989} \times 0.03493 + \text{Btau04018} \times 0.02429 + \text{Btau04053} \times 0.01809 + \text{Btau04080} \times -0.02576 + \text{Btau04104} \times -0.04081 + \text{Btau04188} \times -0.02007 + \text{Btau04200} \times 0.02085 + \text{Btau04236} \times 0.03231 + \text{Btau04242} \times 0.02913 + \text{Btau04312} \times 0.02161 + \text{Btau04361} \times -0.02518 + \text{Btau04377} \times 0.02292 + \text{Btau04394} \times -0.02502 + \text{Btau04443} \times 0.02239 + \text{Btau04477} \times -0.02293 + \text{Btau04480} \times 0.03328 + \text{Btau04517} \times 0.0661 + \text{Btau04568} \times 0.02455 + \text{Btau04630} \times 0.03752 + \text{Btau04634} \times -0.0239 + \text{Btau04787} \times -0.01753 + \text{Btau04808} \times 0.0201 + \text{Btau04942} \times 0.03591 + \text{Btau05141} \times 0.02037 + \text{Btau05398} \times 0.05102 + \text{Btau05450} \times -0.0189 + \text{Btau05468} \times 0.02602 + \text{Btau05555} \times 0.03922 + \text{Btau05565} \times 0.01776 + \text{Btau05594} \times -0.03665 + \text{Btau05638} \times -0.02257 + \text{Btau05673} \times -0.02969 + \text{Btau05707} \times 0.02397 + \text{BtauMC1R} \times 0.11816$

표 2. 한우 판별 마커의 게노타입 대치값 및 게노타입 손실값

SNPID	Genotype 대치값			Missing	SNPID	Genotype 대치값			Missing
Btau00423	CC=0	AC=1	AA=2	0.206	Btau05654	TT=0	TC=1	CC=2	0.870
Btau00498	GG=0	AG=1	AA=2	0.554	Btau06056	GG=0	AG=1	AA=2	0.491
Btau00542	TT=0	TC=1	CC=2	0.811	Btau06717	AA=0	AG=1	GG=2	0.839
Btau00664	AA=0	AG=1	GG=2	0.897	Btau06760	CC=0	TC=1	TT=2	0.427
Btau00673	TT=0	TA=1	AA=2	0.650	Btau06782	CC=0	TC=1	TT=2	0.701
Btau00852	TT=0	TC=1	CC=2	0.650	Btau06907	CC=0	AC=1	AA=2	0.682
Btau00853	CC=0	TC=1	TT=2	0.448	Btau06816	GG=0	AG=1	AA=2	0.487
Btau00926	CC=0	AC=1	AA=2	0.520	Btau06829	GG=0	AG=1	AA=2	0.839
Btau01038	AA=0	AG=1	GG=2	0.977	Btau06845	AA=0	AG=1	GG=2	0.470
Btau01227	TT=0	TC=1	CC=2	0.289	Btau06860	GG=0	AG=1	AA=2	0.509
Btau01307	TT=0	TC=1	CC=2	0.774	Btau06932	TT=0	TC=1	CC=2	0.482
Btau01591	CC=0	TC=1	TT=2	0.858	Btau06989	AA=0	AG=1	GG=2	0.618
Btau01782	GG=0	AG=1	AA=2	0.231	Btau09018	AA=0	AG=1	GG=2	0.397
Btau01804	TT=0	TC=1	CC=2	0.877	Btau09053	CC=0	TC=1	TT=2	0.951
Btau01839	TT=0	TC=1	CC=2	0.745	Btau09080	CC=0	TC=1	TT=2	0.780
Btau02018	GG=0	AG=1	AA=2	0.604	Btau09104	GG=0	AG=1	AA=2	0.557
Btau02037	CC=0	TC=1	TT=2	0.955	Btau09188	GG=0	TC=1	TT=2	0.859
Btau02109	TT=0	TC=1	CC=2	0.797	Btau09200	AA=0	AG=1	GG=2	0.750
Btau02133	AA=0	AG=1	GG=2	0.674	Btau09236	CC=0	GC=1	GG=2	0.748
Btau02265	CC=0	GC=1	GG=2	0.420	Btau09242	CC=0	TC=1	TT=2	0.919
Btau02266	TT=0	TC=1	CC=2	0.933	Btau09312	CC=0	GC=1	GG=2	0.986
Btau02348	CC=0	TC=1	TT=2	0.647	Btau09361	CC=0	TC=1	TT=2	0.922
Btau02443	GG=0	AG=1	AA=2	0.829	Btau09377	TT=0	TC=1	CC=2	0.927
Btau03016	CC=0	TC=1	TT=2	0.744	Btau09394	CC=0	AC=1	AA=2	0.918
Btau03062	CC=0	TC=1	TT=2	0.717	Btau09443	GG=0	AG=1	AA=2	0.996
Btau03108	AA=0	AG=1	GG=2	0.727	Btau09477	GG=0	AG=1	AA=2	0.364
Btau03113	TT=0	TC=1	CC=2	0.966	Btau09480	CC=0	AC=1	AA=2	0.461
Btau03217	CC=0	AC=1	AA=2	0.834	Btau09517	CC=0	TC=1	TT=2	0.361
Btau03224	GG=0	AG=1	AA=2	0.492	Btau09568	CC=0	TC=1	GG=2	0.422
Btau03234	TT=0	TC=1	CC=2	0.872	Btau09630	TT=0	TC=1	GG=2	0.855
Btau03256	CC=0	TC=1	TT=2	0.770	Btau09634	AA=0	AG=1	GG=2	0.824
Btau03281	GG=0	AG=1	AA=2	0.905	Btau09787	GG=0	AG=1	AA=2	0.956
Btau03290	GG=0	AG=1	AA=2	0.776	Btau09808	GG=0	AG=1	AA=2	0.514
Btau03315	TT=0	TC=1	CC=2	0.949	Btau09942	TT=0	TC=1	CC=2	0.357
Btau03318	TT=0	TC=1	CC=2	0.892	Btau05141	TT=0	TC=1	CC=2	0.760
Btau03324	GG=0	AG=1	AA=2	0.832	Btau05398	CC=0	TC=1	TT=2	0.209
Btau03334	TT=0	TA=1	AA=2	0.294	Btau05450	CC=0	TC=1	TT=2	0.855
Btau03344	CC=0	GC=1	GG=2	0.637	Btau05468	AA=0	AG=1	GG=2	0.487
Btau03413	GG=0	AG=1	AA=2	0.846	Btau05553	TT=0	TA=1	AA=2	0.930
Btau03478	CC=0	TC=1	TT=2	0.800	Btau05565	TT=0	TC=1	GG=2	0.809
Btau03486	TT=0	TC=1	GG=2	0.724	Btau05594	TT=0	TC=1	GG=2	0.959
Btau03514	GG=0	AG=1	AA=2	0.494	Btau05638	TT=0	TC=1	CC=2	0.973
Btau03557	TT=0	TC=1	CC=2	0.629	Btau05673	CC=0	TC=1	TT=2	0.823
Btau03572	GG=0	AG=1	AA=2	0.532	Btau05707	CC=0	AC=1	AA=2	0.960
Btau03612	TT=0	TC=1	CC=2	0.796	BtauMC1R	TT=0	TC=1	CC=2	0.558